

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click **Display Selected**.
- To print/save clean copies of selected records from browser click **Print/Save Selected**.
- To have records sent as hardcopy or via email, click **Send Results**.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			<b>Format</b>
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected <b>Full</b>

# 1. ☒ 14/19/1

003793917

WPI Acc No: 1983-790155/198342

XRAM Acc No: C83-100056

XRPX Acc No: N83-183804

**Haemostatic tissue-adhesive collagen wound dressing in lint or sponge - contg. 0.3-2cm collagen layer coated on at least one side with 0.2-2mm fibrinogen layer**

Patent Assignee: DR RULAND NACHAS GM (NACH-N); RUHLAND NACHF GMBH DR (RUHL-N)

Inventor: STEMBERGER A

Number of Countries: 012 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 90997	A	19831012	EP 83102773	A	19830321	198342 B
DE 3212412	A	19831013	DE 3212412	A	19820402	198342
JP 58185162	A	19831028				198349
DE 3212412	C	19860102				198602
EP 90997	B	19891018				198942
DE 3380727	G	19891123				198948
JP 90060339	B	19901217	JP 8358557	A	19830402	199103

Priority Applications (No Type Date): DE 3212412 A 19820402

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; A3...8544; EP 49469; EP 59265; EP 68047; FR 2422407; No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 90997	A	G	13		

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

EP 90997 B G

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Abstract (Basic): EP 90997 A

New dry, tissue-adhesive, falt, collagen plus fibrinogen wound dressing in lint or sponge form is constructed in sheets by freeze-drying a collagen/fibrinogen combination. It contains a collagen layer 0.3-2 cm in thickness on at least one surface of which is a fibrinogen layer 0.2-2 mm in thickness contg. fibrinogen in an amount of 0.5-10 mg/square cm., anchored in the collagen layers.

The fibrinogen used pref. contains SH groups, advantageously introduced by sulphydrylation or by reduction of disulphide bridges. The collagen pref. has a purity expressed as the nitrogen: 4-hydroxyproline ratio of less than 4 (esp. less than 3). The dressing advantageously additionally contains a pharmaceutically active substance. Thus, at least one layer advantageously contains antifibrinolytics and/or polyvalent protease inhibitors and/or thrombin (not in the fibrinogen layer) and/or antibiotics (esp. gentamycin).

Used as self-adhesive haemostatic wound dressings for use during surgical operations.

Abstract (Equivalent): EP 90997 B

Dry, fleecy or spongy tissue-adherent flat collagenous dressing

made of collagen and fibrinogen, characterised in that the dressing is made in layers by freeze-drying a collagen/fibrinogen combination and contains a collagen layer which is 0.3-2 cm. thick and which has on at least one surface a fibrogen layer which is 0.2-2 mm. thick with a fibrinogen content of from 0.5-10 mg/cm<sup>2</sup> and is anchored in the collagen. (5pp)

Title Terms: HAEMOSTATIC; TISSUE; ADHESIVE; COLLAGEN; WOUND; DRESS; LINT; SPONGE; CONTAIN; COLLAGEN; LAYER; COATING; ONE; SIDE; FIBRINOGEN; LAYER

Derwent Class: A96; B07; D22; F07; P32; P34

International Patent Class (Additional): A61F-001/00; A61F-013/00; A61L-015/04

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C01; A12-V03A; B04-B04A; B12-A07; B12-H04; D09-C; F02-C01; F04-E04

Plasdoc Codes (KS): 0231 1986 2397 2537 2654 3252 2672 3286

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 013 04- 256 402 49- 491 525 54& 55& 575 596 597 600 645 662

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M431 M782 M903 P815 P942 R041 V614 V752

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2001 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

✓ Select All	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	<b>Format</b>
X Clear Selections				Full

© 2001 The Dialog Corporation plc

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Patentschrift  
11 DE 3212412 C2

51 Int. Cl. 4:  
A61L 15/04

21 Aktenzeichen: P 32 12 412.0-45  
22 Anmeldetag: 2. 4. 82  
43 Offenlegungstag: 13. 10. 83  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 2. 1. 86

-- VERFILMT

DE 3212412 C2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Dr. Ruhland Nachf. GmbH, 8425 Neustadt, DE

74 Vertreter:

Eitle, W., Dipl.-Ing.; Hoffmann, K., Dipl.-Ing.  
Dr.rer.nat.; Lehn, W., Dipl.-Ing.; Fuchsle, K.,  
Dipl.-Ing.; Hansen, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,  
Pat.-Anw., 8000 München

72 Erfinder:

Stemberger, Axel, Dr.rer.nat., 8014 Neubiberg, DE

56 Im Prüfungsverfahren entgegengehaltene  
Druckschriften nach § 44 PatG:

DE-OS 31 05 624  
DE-OS 30 37 513  
DE-OS 29 14 822

AT-Z: Wiener Medizinische Wochenschrift, Nr. 7,  
S. 86-89;

51 Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage

*Konformation am Kollagenstrukturm.  
Fibrinogen zugeb.*

## Patentansprüche:

1. Trockene, schwammförmige, gewebeverklebbare flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen, wobei die Kollagenschicht einseitig oder beidseitig beschichtet ist, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine 0,3 bis 2 cm dicke Kollagenschicht enthält, die wenigstens an einer Oberfläche eine 0,2 bis 2 mm dicke Fibrinogenschicht mit einer Fibrinogenmenge von 0,5 bis 10 mg/cm<sup>2</sup> aufweist, wobei eine Verankerung der Fibrinogenmoleküle mit den Kollagenmolekülen im Grenzgebiet der Schichten vorliegt.

2. Wundauflage gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen SH-Gruppen enthält.

3. Wundauflage gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen SH-Gruppen enthält, die entweder durch nachträgliche Sulfhydrylierung in das Fibrinogenmolekül eingebracht oder durch Reduktion der Disulfidbrücken im Fibrinogenmolekül gebildet wurden.

4. Wundauflage gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen Arzneimittelwirkstoff enthält.

5. Wundauflage gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie in wenigstens einer der Schichten Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren und/oder Thrombin enthält, wobei jedoch die Kombination Thrombin-Fibrinogen in einer Schicht ausgeschlossen ist.

6. Wundauflage gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Arzneimittelwirkstoff ein Antibiotikum ist.

7. Wundauflage gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Antibiotikum Gentamycin ist.

8. Wundauflage gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Kollagen einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Gewichtsverhältnis von Stickstoff zu 4-Hydroxyprolin von < 4, vorzugsweise < 3 hat.

Kollagen wird seit geraumer Zeit in der Chirurgie verwendet. Es kann in Form von Schwämmen oder Fasern zur Blutstillung verwendet werden und ist auch nach entsprechender Modifizierung zur Beschleunigung der Wundheilung geeignet. Bei Patienten mit defekter Blutgerinnung oder bei großflächigen Blutungen genügen übliche kollagene Wundauflagen nicht. Man hat daher bereits versucht, Kollagenmaterial mit dem Gewebe zu verkleben, wobei man Kleber auf Basis Resorcin-Formaldehyd, Kollagen oder Gelatine verwendete. Solche Kleber sind zwar hämostytisch, jedoch wegen ihrer Toxizität für die Praxis ungeeignet. Dies gilt auch für Acrylatkleber und die Kombination mit kollagenen Wundauflagen.

Es ist bekannt, daß Kollagen kovalente Vernetzungen mit Bindegewebebestandteilen eingehen kann. Dabei finden Vernetzungen vom Kollagen über Schiff-Basen sowie Aldolkondensation statt. Bekannt ist auch, daß bei Basalmembranen die Gewebefestigkeit zusätzlich durch S-S-Brücken des Basalmembrankollagens erreicht wird. Bekannt ist weiterhin, Proteine, wie Albumin mit intermolekularen S-S-Bindungen nach milder Reduktion und

nachfolgender Oxidation über S-S-Brücken zu vernetzen.

Bei Verletzungen bildet sich durch die Blutgerinnung ein primärer Wundverschluß. Hierfür sind aggregierte Thrombozyten und ein Fibrinnetzwerk verantwortlich. Es ist bekannt, daß einzelne Fibrinmoleküle durch Transglutaminasen (wie Faktor XIII) vernetzt werden. Hierbei bilden sich neue Peptidbindungen zwischen Glutaminsäure und Lysin benachbarter Ketten. Mit der Technik der Fibrinklebung, also durch Verwendung von Fibrinogen und Thrombin, wird die Endphase der plasmatischen Blutgerinnung nachgeahmt.

Die Fibrinklebung allein ist nicht in der Lage, großflächige Blutungen zu stillen. Dies gelingt erst durch eine kombinierte Anwendung der Fibrinklebung mit einer resorbierbaren kollagenen Wundauflage. Jedoch muß man dabei drei Komponenten bereithalten, nämlich die kollagene Wundauflage, Thrombinlösung mit Antifibrinolytika und eine tiefgefrorene hochkonzentrierte Fibrinogenlösung. Da Blutungen häufig plötzlich und unprogrammiert auftreten, stehen diese drei Komponenten im entscheidenden Augenblick häufig nicht anwendungsbereit zur Verfügung, denn zumindest die tiefgefrorene Fibrinogenlösung muß zuvor aufgetaut werden. Auch das Mischen vor der Applikation ist verhältnismäßig kompliziert.

In der »Wiener medizinischen Wochenschrift Nr. 7 (1976)« wird auf den Seiten 86 bis 89 über die lokale Anwendung von Fibrinogen und Kollagen zur Blutstillung in der Herzchirurgie berichtet. Bei der Technik der dort beschriebenen Klebung verwendet man humanes Fibrinogen-Kryopräzipitat, Thrombin, ein Faktor-XIII-Konzentrat sowie ein Kollagenvlies. Das Fibrinogen wird auf die gewünschte Stelle aufgebracht und dort durch den Zusatz der Thrombinlösung und von Faktor XIII zur Gerinnung gebracht. Bei stärkeren Blutungen wendet man das Kollagenvlies als vollständig resorbierbare Trägersubstanz an, wobei man auf das Kollagenvlies die Lösungen aufträgt und anschließend das Kollagen mit der mit Fibrinogen beschichteten Seite auf die blutende Stelle aufpreßt. Dadurch soll eine vollständige Auspolymerisierung des Fibrins und Haftung der Fibrinfasern im Gewebe erfolgen. Bei dieser Klebetechnik erfolgt die Beschichtung des Kollagens mit Fibrinogen erst unmittelbar vor der Anwendung, um ein Kollabieren des Kollagenschwammes weitgehend zu vermeiden.

In der DE-OS 31 05 624 (nachveröffentlichter Stand der Technik) wird eine gewebeverklebbare, flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen beschrieben, wobei der Kollagenträger einseitig oder beidseitig beschichtet ist, so daß dieses Material über längere Zeit in gebrauchsfertigem Zustand lagerfähig ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, dem Chirurgen eine kollagene Wundauflage zur Verfügung zu stellen, die in vorbereiteter Form direkt während der Operation angewendet werden kann und wobei die vorerwähnten Nachteile der Fibrinklebung in Kombination mit resorbierbarem Kollagen nicht auftreten. Verbunden mit dieser Aufgabe ist es, eine lagerfähige Kollagenzubereitung zur Verfügung zu stellen, die die für die Einleitung der lokalen Hämostase erforderlichen Komponenten enthält.

Diese Aufgabe wird durch eine gewebeverklebbare, kollagene Wundauflage gemäß dem Anspruch 1 gelöst.

Die erfindungsgemäße Wundauflage hat einen schichtweisen Aufbau. Die Hauptschicht besteht hierbei

aus dem Kollagen, und zwar hat diese Schicht eine Dicke zwischen 0,3 und 2 cm, vorzugsweise 0,7 bis 1 cm. Einseitig oder beidseitig auf dieser Kollagenschicht befindet sich eine Fibrinogenschicht. Diese Fibrinogenschicht hat eine Dicke von 0,2 bis 2 mm und wird auf die Kollagenoberfläche aufgebracht, wobei eine Verankerung der Fibrinogenmoleküle mit den Kollagenmolekülen im Grenzgebiet der Schichten vorliegt.

Wesentlich ist, daß die Fibrinogenschicht, Fibrinogen in einer Menge von 0,5 bis 10 mg, vorzugsweise 4 mg/cm<sup>2</sup> enthält.

Es ist häufig vorteilhaft, wenn das Fibrinogen das einseitig oder beidseitig auf das Kollagen als Schicht aufgebracht wird, freie SH-Gruppen enthält. Diese freien SH-Gruppen können zuvor in dem Fibrinogen durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken ausgebildet sein, oder indem man Fibrinogen mit SH-Gruppen haltigen Fibrinogen abmischt. Weiterhin ist es auch möglich, die in Fibrinogen enthaltenen Disulfidbrücken unverändert zu lassen und zusätzlich SH-Gruppen einzubauen, z. B. nach der Methode von Benesch & Benesch in »Proceedings of the National Academy of the USA, Washington«, Band 44, 1958, S. 848 bis 853 oder Biochem. Journ. 1966 101, Seiten 717 bis 720 (Stephen und Mitarbeiter).

Es kann vorteilhaft sein, wenn neben dem Fibrinogen wenigstens eine der Schichten noch Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren enthält, wobei außerdem noch Thrombin vorhanden sein kann, mit dem Proviso, daß das Thrombin sich nicht in der gleichen Schicht oder in unmittelbarem Kontakt mit Fibrinogen befindet.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen kollagenen Wundauflage kann in folgender Weise erfolgen:

Zunächst wird Kollagen in an sich bekannter Weise präpariert. Das Kollagen soll dabei vorzugsweise einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Gewichtsverhältnis von Stickstoff zu Hydroxyprolin < 4, insbesondere < 3 aufweisen.

$$\text{Faktor N/Hyp} = \frac{\text{mg N}}{\text{mg 4-Hyp}}$$

Eine 1,5%ige Kollagenlösung in 0,05%iger Essigsäure wird in bekannter Weise zu einem 0,5 cm dicken Kollagenschwamm gefriergetrocknet. Erwünschtenfalls kann man bei dieser Gefrier Trocknung auch eine Lösung einsetzen, welcher man zuvor Antifibrinolytika (Tranexamsäure) und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren (Aprotinin) zugegeben hat, wobei diese in solchen Mengen zugegeben werden, daß im fertigen Kollagenschwamm pro cm<sup>2</sup> eine Konzentration von 0,2 bis 10 mg bzw. 4 bis 1000 KIE (Kalium-Inhibition-Einheiten) vorliegt.

Getrennt von der Herstellung des Kollagenschwamms wird eine Fibrinogenlösung wie folgt hergestellt:

Fibrinogen für Infusionszwecke wird in isot. NaCl bis zu einer Konzentration von 30 mg Fibrinogen pro ml gelöst. Diese Lösung wird dann mit einer üblichen Sprühvorrichtung auf den zuvor hergestellten Kollagenschwamm unter sterilen Kautelen in einer Dicke von 0,2 bis 2 mm aufgesprüht, die eine Menge von 0,5 bis 10 mg/cm<sup>2</sup> ergibt, wobei die dabei ausgebildete Schichtdicke in der Regel 2 mm Schichthöhe nicht übersteigen darf, weil sonst die Haftung dieser Schicht schlecht ist. Gewünschtenfalls können auch in die Fibrinogenschicht Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren eingearbeitet werden.

Es ist bekannt, Kollagen als Träger für Antibiotika, wie Gentamycin zu verwenden. Auch die erfindungsgemäßen Wundauflagen können Wirkstoffe enthalten, beispielsweise Gentamycin, Tetracyclin oder andere Antibiotika oder Chemotherapeutika.

#### Herstellung von Kollagen

Von allen Pigmentschichten und Muskelresten befreite frische Rindersehnen wurden homogenisiert und eine Menge, die 100 g Trockengewicht entspricht, in 31 0,05 m Zitratpuffer (pH 3,7) 24 Stunden lang extrahiert und anschließend gegen 1% Essigsäure 12 Stunden dialysiert.

Das in 31 1% Essigsäure suspendierte Gewebe wird 48 Stunden bei 10°C unter ständigem Rühren mit Pepsin im Verhältnis Kollagen : Pepsin = 50 : 1 inkubiert.

Der Ansatz wird mit 1% Essigsäure auf 5 l verdünnt und durch Zentrifugation von den ungelösten Sehnenfragmenten befreit.

Die viskose Kollagenlösung wird gegen alkalisiertes Leitungswasser (pH 8,0) dialysiert und dann scharf zentrifugiert. Der Rückstand wird erneut in 5 l 1% Essigsäure gelöst und dialysiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der Faktor Stickstoff : 4-Hydroxyprolin < 3 ist. Nach dem letzten Dialysieren wird mit 0,05% Essigsäure eine 1,5%ige Kollagenlösung hergestellt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Zur Herstellung einer Antifibrinolytika- und/oder Proteinaseinhibitor-haltigen Kollagenschwammes von 10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung mit 0,2 g Tranexamsäure und/oder 40 000 KIE Aprotinin versetzt und gefriergetrocknet.

Zur Herstellung eines Kollagen-Gentamycin-Schwamms von 10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung auf pH 1 bis 2 eingestellt, mit 100 mg Gentamycinsulfat versetzt und gefriergetrocknet.

#### Herstellung von Fibrinogenlösung

Im Handel befindliches steriles Fibrinogen wird in steriler isotoner NaCl gelöst, so daß eine Lösung von 30 mg Fibrinogen/ml Lösung vorliegt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Um ein SH-Gruppen-modifiziertes Fibrinogen zu erhalten, arbeitet man wie folgt:

Fibrinogen wird in isotoner Kochsalzlösung bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. 10 ml dieser Fibrinogenlösung werden mit 1 ml einer N-Acetylhomocysteinethiolaktionlösung (60 mg/ml Aqua dest) und 10 ml eines Carbonatpuffers (pH 10,6) versetzt und bei 0°C 35 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 40 ml eines Phosphatpuffers pH 7,0 gestoppt. Anschließend wird mit der Technik der Membranfiltration unter Verwendung eines Filters (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 5000) die Lösung entsalzt und gleichzeitig eingeeengt.

#### Herstellung von Wundauflagen, die Kollagen und Fibrinogen enthalten

Es wird zunächst 100 ml einer 1%igen Kollagenlösung in eine Metallform von 10 x 10 cm gegeben, nach üblicher Technik gefriergetrocknet und der resultierende Schwamm dann sterilisiert. Unter aseptischen Bedingungen wird nun dieser sterilisierte Kollagenschwamm mit einer Fibrinogenlösung besprüht, wobei pro Quadratcentimeter Kollagenoberfläche 5 mg Fibrinogen

unkl  
unhy  
dwick

aufgetragen werden.

Anschließend erfolgt eine erneute Gefriertrocknung und Verpackung unter sterilen Kautelen.

Die Kollagenschicht hat eine Dicke von 10 mm und die darauf befindliche Fibrinogenschicht eine Dicke von ca. 0,3 mm.

Resultate der in vitro und in vivo Versuche mit Kollagen-Fibrinogen- sowie Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen-Schwämmen.

#### In vitro

Die so hergestellten Wundauflagen wurden mit einer Reißfestigkeitsmaschine getestet, bestehend aus einem Kraftaufnehmer, verbunden mit einem Schreiber. Die Eichung erfolgte im Bereich von 100 bis 1000 Pond. Die Kollagen-Fibrinogenschwämme wurden mit der Kollagen- 15  
seite auf eine Plastikscheibe ( $D=1$  cm) mittels eines technischen Klebers geklebt. Die Fibrinogenbeschichtete Seite wurde dann mit 0,1 ml Thrombinlösung (1000 NIH/ml) (NIH = National Institute of Health) befeuch- 20  
tet und nach 20 Minuten in der Testmaschine die Reißfestigkeit bestimmt. Es resultierten Werte von 730 Pond/cm<sup>2</sup> (Mittelwert aus 7-Messungen).

#### In vivo

In einer Studie an 400 Ratten wurden die (Gentamycin) Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen zur Anastomosensicherung am Colon mit der herkömmlichen Gewebeklebung mit Plasmafraktionen (Fibrinkleber = FK) untersucht. 30

- a) Kontrollgruppe (Enterotomien mit 7 invertierenden Einzelknopfnähten nach Lembert). 35
- b) zusätzliche Applikation von FK
- c) FK mit Kollagenvlies (fibrinogen-, gentamycin-frei)
- d) Nahtsicherung mit Kollagen-Fibrinogen-Wundauflage
- e) Kollagen-Fibrinogen-Wundauflage mit Gentamycin (1 mg/cm<sup>2</sup>) 40

In der Initialphase der Wundheilung zeigten die mit verschiedenen Klebesystemen behandelten Tiere bis zum 3. postoperativen Tage im Nahtbereich eine deutlich höhere Wundfestigkeit. Gegenüber der herkömmlichen Klebetechnik mit Fibrin waren bei Verwendung von erfindungsgemäßen Wundauflagen Adhäsionen im Wundbereich vermindert. Durch die Applikation der Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen Wundauflagen wurde eine kontrollierte Freigabe des Antibiotikums beobachtet, die Serumkonzentrationen lagen weit unter der toxischen Grenze. 45

In einer weiteren Versuchsserie wurden Hemihepatektomien bei 5 Schweinen durchgeführt und nach Ligatur der faßbaren Arterien und Venen die blutenden Parenchymdefekte mit Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen versorgt. Im folgenden postoperativen Verlauf wurden Nachblutungen nie beobachtet, die Resorption der Materialien war nach 12 Wochen abgeschlossen. 50

Mit den (Gentamycin) Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen steht ein Material zur Verfügung, das bei einfacher, rascher, sicherer Handhabung ausgezeichnet zur Blutstillung eingesetzt werden kann. Weiter wird eine Verbesserung der Wundheilung bei gleichzeitigem Antibiotikenschutz beobachtet. 60